

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 27 AUG 2004	
WIPO	PCT



EP04/7434

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 32 620.0

Anmeldetag: 18. Juli 2003

Anmelder/Inhaber: Eppendorf AG,
22339 Hamburg/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen

IPC: C 12 Q 1/68

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 22. Juli 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Letang

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel:(0)-40-6562051 Fax:-6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

15. Juli 2003

Uns. Zeichen: 03485

Eppendorf AG

Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen.

Um Biomoleküle in einer biomedizinischen Probe mit einer hohen Empfindlichkeit nachzuweisen, wird in bioanalytischen Labors sehr häufig das ELISA-Verfahren (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) angewandt. Dieses Verfahren ermöglicht die Detektion von Biomolekülen bis zu einer Mindestnachweisgrenze von 100.000 Molekülen (10^{-18} Mol).

Für die Serumanalytik oder die Genexpressionsforschung ist diese Methode zu unempfindlich, da die hier nachzuweisenden Proteine oder Peptide häufig in sehr viel geringeren Mengen vorliegen.

Im Stand der Technik sind Methoden bekannt, die eine wesentlich gesteigerte Nachweisempfindlichkeit bieten. Ein solches Verfahren ist z.B. in der US 5,665,539 für den Nachweis jeweils eines bestimmten Biomoleküls offenbart ("Immuno-PCR"). Bei diesem Verfahren wird das Biomolekül ortsspezifisch,

z.B. über vorgelegte Antikörper, an eine Trägermatrix gebunden. Anschließend wird die Matrix mit einem für das gesuchte Biomolekül spezifischen Antikörper inkubiert, und die nicht gebundenen Antikörper in einem Waschschrift entfernt.

Die gebundenen Antikörper sind mit einem Nukleinsäuremolekül markiert, das mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird und dessen Amplifikationsprodukte zunächst in Lösung gehen und dann mit Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden.

Das Verfahren profitiert dabei von der außerordentlich hohen Spezifität der PCR und der guten quantitativen Repräsentierbarkeit. Die Nachweisgrenze für zu detektierende Biomoleküle liegt daher unter geeigneten Bedingungen zwischen drei und fünf Größenordnungen unter der von ELISA-Verfahren.

Bei dem Verfahren besteht jedoch keine Spezifität zwischen dem zu detektierenden Protein und dem amplifizierten Nukleinsäuremarker. Das Verfahren eignet sich daher nur zur hochempfindlichen Detektion eines einzigen, zu detektierenden Biomolekültyps.

In der US 6,531,283 ist ein ähnliches Verfahren offenbart, bei dem die gebundenen Antikörper mit einem Nukleinsäuremolekül markiert sind, das mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (RCA) vervielfältigt wird. Dabei werden die Amplifikationsprodukte im Sinne einer Kettenverlängerung an die Nukleinsäuremoleküle angehängt, so daß ein Konkatenat entsteht, das vielfache Repetitionen der ursprünglichen Markersequenz aufweist, und in situ mit geeigneten Methoden nachgewiesen werden kann, z.B. durch Anhybridisierung fluoreszenzmarkierter Nukleinsäureabschnitte, die zu der repetitiven Sequenz komplementär sind.

Nachteilig ist hier, daß nur eine begrenzte Auswahl an Replikationsenzymen verwendet werden kann, wie z.B. die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Aus diesem Grund ist man auf die Eigenschaften der verwendbaren Polymerasen beschränkt. Insbesondere bei der Wahl der Inkubationstemperatur ist diese Einschränkung ein großer Nachteil. Überdies macht die Methode die Verwendung eines zirkulären Primers (Amplification Target Cycle), der Sequenzhomologien mit den an die Antikörper gebundenen Nukleinsäuremolekülen aufweisen muß

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren bereit zu stellen, mit dem Biomoleküle unter Umgehung der zuvor geschilderten Nachteile in einer Probe mit sehr hoher Empfindlichkeit und Spezifität nachgewiesen werden können. Weitere Aufgabe ist, ein Verfahren zur Herstellung eines Markers bereitzustellen, der in einem solchen Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen verwendet werden kann, sowie einen solchen Marker selbst herzustellen.

Diese Aufgaben werden mit den Merkmalen des Anspruches 1 oder 2, mit den Merkmalen des Anspruchs 26 und mit den Merkmalen des Anspruchs 43 gelöst.

Gemäß Anspruch 1 ist vorgesehen, die nachzuweisenden Biomoleküle mit einer ersten Substanz zu koppeln, die Teil eines nukleinsäurereplizierenden Apparates ist,

die gebildeten Biomolekül-Substanz-Komplexe an für die jeweiligen Biomoleküle spezifische, festphasengebundene Bindungsmoleküle zu binden,

ggf. die nicht gebundenen Biomolekül-Substanz-Komplexe durch Waschen zu entfernen,

die gebundenen Biomolekül-Substanz-Komplexe mit hochmolekularen Nukleinsäuremolekülen und Mononukleotiden verschiedener Spezies, von denen mindestens die Mononukleotide einer Spezies mit einer detektierbaren Markierung versehen sind, sowie einer zweiten Substanz zu inkubieren, die die an die Biomole-

küle gekoppelte erste Substanz zu einem funktionsfähigen replizierenden Apparat für hochmolekulare Nukleinsäuren ergänzt, der die hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle bindet und unter Einbau markierter Mononukleotide Replikate der hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle erzeugt, die nicht abdissoziieren, ggf. die in Lösung befindlichen hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle und Mononukleotide durch Waschen zu entfernen und über den Nachweis der markierten Replikate die zu detektierenden Biomoleküle zu bestimmen.

Während bei herkömmlichen Immunoassays, bei denen die immobilisierten Biomoleküle mit einem markierten Antikörper oder einer Antikörperkaskade inkubiert werden und daher jedes zu detektierende Biomolekül nur mit einer oder wenigen Markierungen versehen werden kann, kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren jedes zu detektierende Biomolekül mit sehr viel mehr Markierungen versehen werden, da in das replizierte Nukleinsäuremolekül, das als detektierbarer Marker dient, eine Vielzahl von markierten Mononukleotiden eingebaut wird. Es entsteht also im Vergleich zu herkömmlichen Assays ein sehr viel stärker amplifiziertes Signal. Die Identifizierung der markierten Biomoleküle erfolgt schließlich über die spezifischen, festphasengebundenen Bindungsmoleküle, deren Identität und Position dem jeweiligen Anwender bekannt ist.

Aufgrund des sehr viel stärker amplifizierten Signals liegt die Mindestnachweisgrenze der erfindungsgemäßen Verfahrens wesentlich niedriger als bei Immunoassays. Eine solch hohe Empfindlichkeit macht jedoch eine hohe Spezifität bei der Amplifikation erforderlich. Diese wird im erfindungsgemäßen Verfahren durch die außerordentlich hohe Spezifität, mit der biologische nukleinsäurereplizierende Apparate ein vorhandenes hochmolekulares Nukleinsäuremolekül replizieren, gewährleistet.

Dabei ist das Verfahren nicht auf einige wenige DNA-Polymerasen beschränkt, durch deren ganz spezifische Eigenschaften es z.B. in Bezug auf die Reaktionstemperaturen limitiert sein könnte, da bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Vielzahl von nukleinsäurereplizierenden Apparaten zur Verwendung kommen.

Die in Anspruch 2 offenbarte Methode stellt eine ebenso vorteilhafte Variation der Methode gemäß Anspruch 1 dar. Demnach ist vorgesehen, immobilisierte Biomoleküle mit Verbindungskomplexen zu inkubieren, die aus für die jeweiligen Biomoleküle spezifischen Bindungsmolekülen sowie einer ersten Substanz bestehen, die Teil eines nukleinsäurereplizierenden Apparates ist, ggf. die nicht gebundenen Verbindungskomplexe durch Waschen zu entfernen, die gebildeten Biomolekül-Verbindungskomplexe mit hochmolekularen Nukleinsäuremolekülen und Mononukleotiden verschiedener Spezies, von denen mindestens die Mononukleotide einer Spezies mit einer detektierbaren Markierung versehen sind, sowie einer zweiten Substanz zu inkubieren, die die an die Biomoleküle gekoppelte erste Substanz zu einem funktionsfähigen replizierenden Apparat für hochmolekulare Nukleinsäuren ergänzt, der die hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle bindet und unter Einbau markierter Mononukleotide Replikate der hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle erzeugt, die nicht abdissoziieren, ggf. die in Lösung befindlichen hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle und Mononukleotide durch Waschen zu entfernen, und über den Nachweis der markierten Replikate die zu detektierenden Biomoleküle zu bestimmen.

Im Unterschied zu Anspruch 1 werden hier also nicht die nachzuweisenden Biomoleküle, sondern spezifische Bindungsmoleküle zunächst mit der ersten Substanz zu Verbindungskomplexen gekoppelt, die dann mit den nachzuweisenden

Biomolekülen inkubiert werden. Dabei sind die Biomoleküle ihrerseits zuvor auf einem Festphasensubstrat immobilisiert worden.

Die Immobilisierung kann z.B. durch unspezifische Adsorption oder kovalente Bindung an ein geeignetes Substrat erfolgen. In einer bevorzugten Ausgestaltung ist jedoch vorgesehen, daß die Biomoleküle durch Bindung an festphasengebundene spezifische Bindungsmoleküle immobilisiert werden, nach Inkubation der Biomoleküle mit den Verbindungskomplexen die nicht gebundenen Verbindungskomplexe ggf. durch Waschen entfernt werden, und vor dem Nachweis der markierten Replikate die in Lösung befindlichen hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle und Mononukleotide ggf. durch Waschen entfernt werden. Dabei erhält man bei der Inkubation der durch die Bindungsmoleküle immobilisierten Biomoleküle mit den Verbindungskomplexen eine als "Sandwich" bekannte Konfiguration.

In vorteilhaften Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die nachzuweisenden Biomoleküle kovalent mit der ersten Substanz gekoppelt werden bzw. daß in den Verbindungskomplexen die Bindungsmoleküle kovalent mit der ersten Substanz gekoppelt werden.

In weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen ist vorgesehen, daß die nachzuweisenden Biomoleküle über Linkersysteme mit der ersten Substanz gekoppelt werden bzw. daß in den Verbindungskomplexen die Bindungsmoleküle über Linkersysteme mit der ersten Substanz gekoppelt werden.

Besonders bevorzugte Linkersysteme sind dabei das Biotin-Streptavidin-System, das ULS-Platin-Linkersystem, das Digoxigenin-System oder ein beliebiges Antigen-Antikörper-System. Es kann jedoch auch jedes andere spezifisch bindende

System verwendet werden. Geeignet sind z.B. alle Systeme, die auf dem Vorhandensein eines Haptens beruhen.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die erste Substanz die β -Untereinheit einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz die restlichen erforderlichen Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält, sich der zuoberst erwähnte nukleinsäurereplizierende Apparat also aus diesen beiden Komponenten zusammensetzt.

Alternativ kann vorgesehen sein, daß die erste Substanz eine oder mehrere Untereinheiten einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III sowie eventuell weitere erforderliche Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.

Ebenso vorteilhaft kann vorgesehen sein, daß die erste Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält und die zweite Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist.

In einer nochmals anderen Ausgestaltung kann vorgesehen sein, daß die erste Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.

Für jede der zuvor genannten Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahren gilt, daß die eigentliche Replikation des hochmolekularen Nukleinsäuremoleküls durch die restlichen Untereinheiten einer DNA-Polymerase III, eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment oder die Taq-DNA-Polymerase erfolgt, während die β -Untereinheit bzw. die β -Untereinheiten für die erforderliche hohe Spe-

zifität und Prozessivität der Replikation sorgt, indem sie die restlichen Untereinheiten bzw. das jeweilige Enzym an das zu replizierende hochmolekulare Nukleinsäuremolekül klammert. Dabei ist die Verwendung jeder in der Technik bekannten DNA-Polymerase III bzw. ihrer Untereinheiten denkbar. Insbesondere ist auch denkbar, Untereinheiten verschiedener DNA-Polymerasen III in Kombination miteinander zu verwenden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist für eine weitere Erhöhung der Spezifität und Prozessivität vorgesehen, daß die Biomolekül-Substanz-Komplexe bzw. die Biomolekül-Verbindungskomplexe zusätzlich zu der zweiten Substanz mit weiteren β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III inkubiert werden.

Der im Zusammenspiel mit einer DNA-Polymerase die Spezifität und die Prozessivität der DNA-Replikation erhöhende Effekt der β -Untereinheit einer DNA-Polymerase III ist z.B. aus der US 6,555,349 bekannt, in der eine Methode zur isothermen Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen offenbart wird, bei der eine Drei-Komponenten-Polymerase verwendet wird, die aus einer DNA-Polymerase (z.B. DNA-Polymerase III), einem Klammer-Komplex (z.B. β -Untereinheiten) und einem Hilfskomplex (z.B. γ -Komplex) besteht. Dabei ist jedoch lediglich die Verwendung zur Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen offenbart. Eine Anwendung im Zusammenhang mit Immunoassays oder zum Nachweis von Biomolekülen aus einer Probe ist in der US 6,555,349 nicht beschrieben.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine zirkuläre Form aufweisen. Dadurch wird sichergestellt, daß weder diese noch die erzeugten und markierten, ebenfalls zirkulären Replikate vom nukleinsäurereplizierenden Apparat abdissoziieren, da die β -Untereinheiten zirkuläre Nukleinsäu-

remoleküle festhalten, während sie lineare Nukleinsäuremoleküle nicht festzuhalten imstande sind.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle jeweils eine Replikationsorigin-Sequenz aufweisen, an der der nukleinsäurereplizierenden Apparat ansetzen kann.

In einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weisen die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine Länge von mindestens 10 kB auf. Auf diese Weise ist sichergestellt, daß eine große Anzahl von markierten Mononukleotiden in die Replikate eingebaut und so eine starke Signalamplifikation erzielt werden kann. Im Vergleich zu einem mit PCR amplifizierten Molekül werden dabei etwa 20 x mehr detektierbare Marker eingebaut.

Dabei ist in besonders vorteilhaften Ausgestaltungen vorgesehen, daß diese Markierungen aus fluoreszierenden, lumineszierenden, radioaktiven oder enzymatischen Markern bestehen. Es können jedoch auch alle anderen geeigneten Marker verwendet werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die festphasengebundenen Bindungsmoleküle auf einem Biochip angeordnet sind. In diesem Falle werden die markierten Replikate besonders bevorzugt mit Biochip-Scannern nachgewiesen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die festphasengebundenen Bindungsmoleküle auf Beads angeordnet sind. In diesem Falle werden die markierten Replikate besonders bevorzugt mit Durchflußdetektoren nachgewiesen.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die festphasengebundenen Bindungsmoleküle oder die immobilisierten Biomoleküle in einem biologischen Präparat angeordnet sind.

Ein solches biologisches Präparat kann z.B. ein histologischer Schnitt, ein Gefrierbruchpräparat oder ein Western-Blot sein, aber auch jedes andere Präparat, das festphasengebundene Bindungsmoleküle oder immobilisierte Biomoleküle aufweist.

In vorteilhaften Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, daß die nachzuweisenden Biomoleküle bevorzugt Aminosäuren, Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Lipide oder Rezeptoren sind, während die Bindungsmoleküle bevorzugt Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder andere spezifisch bindende Moleküle sind.

Gemäß Anspruch 26 ist vorgesehen, ein Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen bereitzustellen, bei dem eine erste Substanz, die Teil eines nukleinsäurereplizierenden Apparates ist und ein Kupplungselement aufweist, mit hochmolekularen Nukleinsäuremolekülen und Mononukleotiden verschiedener Spezies, von denen mindestens die Mononukleotide einer Spezies mit einer detektierbaren Markierung versehen sind, sowie einer zweiten Substanz inkubiert wird, die die erste Substanz zu einem funktionsfähigen replizierenden Apparat für hochmolekulare Nukleinsäuren ergänzt, dergestalt, daß der so gebildete Apparat die hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle bindet und unter Einbau markierter Mononukleotide Replikate der hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle erzeugt, die nicht abdissoziieren.

Ein solchermaßen hergestellter Marker weist im Gegensatz zu den bei herkömmlichen ELISA- oder Sandwich-Assays verwendeten Markern sehr viel mehr detektierbare Markierungen auf. Es entsteht also im Vergleich zu herkömmlichen Assays ein sehr viel stärker amplifiziertes Signal. Folglich liegt die Mindestnachweisgrenze für Biomoleküle bei Verwendung eines mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Markers wesentlich niedriger als bei herkömmlichen Elisa- oder Sandwich-Assays.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung dieses Verfahrens ist vorgesehen, daß das Kupplungselement eine funktionelle Gruppe ist, die mit zu bindenden Molekülen eine kovalente Bindung eingehen kann.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung ist vorgesehen, daß das Kupplungselement Bestandteil eines Linkersystems ist, über das die zu bindenden Moleküle gebunden werden können.

Besonders bevorzugte Linkersysteme sind dabei das Biotin-Streptavidin-System, das ULS-Platin-Linkersystem, das Digoxigenin-System oder ein beliebiges Antigen-Antikörper-System. Es kann jedoch auch jedes andere spezifisch bindende System verwendet werden. Geeignet sind z.B. alle Systeme, die auf dem Vorhandensein eines Haptens beruhen.

In einer bevorzugten Ausgestaltung dieses Verfahrens ist vorgesehen, daß die erste Substanz über das Kupplungselement mit einem Bindungsmolekül verbunden wird, das in der Lage ist, ein Biomolekül spezifisch zu binden.

Es kann ebenso vorteilhaft vorgesehen sein, daß die erste Substanz über das Kupplungselement mit einem Biomolekül verbunden wird, also einem Molekül, das eigentlich nachgewiesen werden soll.

Dabei ist vorgesehen, daß die nachzuweisenden Biomoleküle bevorzugt Aminosäuren, Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Lipide oder Rezeptoren sind, während die Bindungsmoleküle bevorzugt Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder andere spezifisch bindende Moleküle sind.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, daß die erste Substanz die β -Untereinheit einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz die restlichen erforderlichen Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält, sich der zuoberst erwähnte nukleinsäurereplizierende Apparat also aus diesen beiden Komponenten zusammensetzt.

Alternativ kann vorgesehen sein, daß die erste Substanz eine oder mehrere Untereinheiten einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III sowie eventuell weitere erforderliche Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.

Ebenso vorteilhaft kann vorgesehen sein, daß die erste Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält und die zweite Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist.

In einer nochmals anderen Ausgestaltung kann vorgesehen sein, daß die erste Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.

Für jede der zuvor genannten Ausgestaltungen der erfindungsgemäßen Verfahren gilt, daß die eigentliche Replikation des hochmolekularen Nukleinsäuremoleküls

durch die restlichen Untereinheiten einer DNA-Polymerase III, eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment oder die Taq-DNA-Polymerase erfolgt, während die β -Untereinheit bzw. die β -Untereinheiten für die erforderliche hohe Spezifität und Prozessivität der Replikation sorgt, indem sie die restlichen Untereinheiten bzw. das jeweilige Enzym an das zu replizierende hochmolekulare Nukleinsäuremolekül klammert.

Dabei kann für eine weitere Erhöhung der Spezifität und Prozessivität vorgesehen sein, daß die Biomolekül-Substanz-Komplexe bzw. die Biomolekül-Verbindungskomplexe zusätzlich zu der zweiten Substanz mit weiteren β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III inkubiert werden.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine zirkuläre Form aufweisen. Dadurch wird sichergestellt, daß weder diese noch die erzeugten und markierten, ebenfalls zirkulären Replikate vom nukleinsäurereplizierenden Apparat abdissoziieren, da die β -Untereinheiten zirkuläre Nukleinsäuremoleküle festhalten, während sie lineare Nukleinsäuremoleküle nicht festzuhalten imstande sind.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens ist vorgesehen, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle jeweils eine Replikationsorigin-Sequenz aufweisen, an der der nukleinsäurereplizierende Apparat ansetzen kann.

In einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung weisen die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine Länge von mindestens 10 kB auf. Auf diese Weise ist sichergestellt, daß eine große Anzahl von markierten Mononukleotiden in die Replikate eingebaut und so eine starke Signalamplifikation

erzielt werden kann. Im Vergleich zu einem mit PCR amplifizierten Molekül werden dabei etwa 20 x mehr detektierbare Marker eingebaut.

Dabei ist in besonders vorteilhaften Ausgestaltungen vorgesehen, daß diese Markierungen aus fluoreszierenden, lumineszierenden, radioaktiven oder enzymatischen Markern bestehen. Es können jedoch auch alle anderen geeigneten Marker verwendet werden.

Gemäß Anspruch 43 ist vorgesehen, einen Marker zum Nachweis von Biomolekülen bereitzustellen, der mit einem der zuvor geschilderten Verfahren hergestellt wurde.

Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel: (0)-40-6562051 Fax: -6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000

Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

15. Juli 2003

Uns. Zeichen: 03485

Eppendorf AG

Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen, bei dem
 - a) die nachzuweisenden Biomoleküle mit einer ersten Substanz gekoppelt werden, die Teil eines nukleinsäurereplizierenden Apparates ist,
 - b) die gebildeten Biomolekül-Substanz-Komplexe an für die jeweiligen Biomoleküle spezifische, festphasengebundene Bindungsmoleküle gebunden werden,
 - c) ggf. die nicht gebundenen Biomolekül-Substanz-Komplexe durch Waschen entfernt werden,
 - d) die gebundenen Biomolekül-Substanz-Komplexe mit hochmolekulären Nukleinsäuremolekülen und Mononukleotiden verschiedener Spezies, von denen mindestens die Mononukleotide einer Spezies mit einer detektierbaren Markierung versehen sind, sowie einer zweiten Substanz inkubiert werden, die an die Biomoleküle ge-

koppelte erste Substanz zu einem funktionsfähigen replizierenden Apparat für hochmolekulare Nukleinsäuren ergänzt, der die hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle bindet und unter Einbau markierter Mononukleotide Replikate der hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle erzeugt, die nicht abdissoziieren,

- e) ggf. die in Lösung befindlichen hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle und Mononukleotide durch Waschen entfernt werden,
- f) und über den Nachweis der markierten Replikate die zu detektierenden Biomoleküle bestimmt werden.

2. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen, bei dem

- a) immobilisierte Biomoleküle mit Verbindungskomplexen inkubiert werden, die aus für die jeweiligen Biomoleküle spezifischen Bindungsmolekülen und einer ersten Substanz bestehen, die Teil eines nukleinsäurereplizierenden Apparates ist,
- b) ggf. die nicht gebundenen Verbindungskomplexe durch Waschen entfernt werden,
- c) die gebildeten Biomolekül-Verbindungskomplexe mit hochmolekularen Nukleinsäuremolekülen und Mononukleotiden verschiedener Spezies, von denen mindestens die Mononukleotide einer Spezies mit einer detektierbaren Markierung versehen sind, sowie einer zweiten Substanz inkubiert werden, die die an die Biomoleküle gekoppelte erste Substanz zu einem funktionsfähigen replizierenden Apparat für hochmolekulare Nukleinsäuren ergänzt, der die hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle bindet und unter Einbau markierter Mononukleotide Replikate der hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle erzeugt, die nicht abdissoziieren,
- d) ggf. die in Lösung befindlichen hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle und Mononukleotide durch Waschen entfernt werden,

- e) und über den Nachweis der markierten Replikate die zu detektierenden Biomoleküle bestimmt werden.
3. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß
- a) die Biomoleküle vor Inkubation mit den Verbindungskomplexen immobilisiert werden, indem sie an festphasengebundene spezifische Bindungsmoleküle gebunden werden,
 - b) nach Inkubation der Biomoleküle mit den Verbindungskomplexen die nicht gebundenen Verbindungskomplexe ggf. durch Waschen entfernt werden,
 - c) vor dem Nachweis der markierten Replikate die in Lösung befindlichen hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle und Mononukleotide ggf. durch Waschen entfernt werden.
4. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nachzuweisenden Biomoleküle kovalent mit der ersten Substanz gekoppelt werden.
5. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß in den Verbindungskomplexen die Bindungsmoleküle kovalent mit der ersten Substanz gekoppelt werden.
6. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nachzuweisenden Biomoleküle über Linkersysteme mit der ersten Substanz gekoppelt werden.
7. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 2 oder 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß in den Verbindungskomplexen die Bin-

dungsmoleküle über Linkersysteme mit der ersten Substanz gekoppelt werden.

8. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Linkersystem aus der Gruppe gewählt ist, die das Biotin-Streptavidin-System, das ULS-Platin-Linkersystem, das Digoxigenin-System, ein Antigen-Antikörper-System oder ein anderes spezifisch bindendes System umfaßt.
9. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz die β -Untereinheit einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz die restlichen erforderlichen Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.
10. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz eine oder mehrere Untereinheiten einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III sowie eventuell weitere erforderliche Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.
11. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält und die zweite Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist.
12. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 1 - 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-

DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.

13. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Biomolekül-Substanz-Komplexe bzw. die Biomolekül-Verbindungskomplexe zusätzlich zu der zweiten Substanz mit weiteren β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III inkubiert werden.
14. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine zirkuläre Form aufweisen.
15. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle jeweils eine Replikationsorigin-Sequenz aufweisen.
16. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine Länge von mindestens 10 kB aufweisen.
17. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die detektierbare Markierung mindestens einer der zugefügten Mononukleotidspezies aus einer fluoreszierenden, lumineszierenden, radioaktiven oder enzymatischen Markierung besteht.

18. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die festphasengebundenen Bindungsmoleküle auf einem Biochip angeordnet sind.
19. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß die markierten Replikate mit Biochip-Scannern nachgewiesen werden.
20. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der Ansprüche 1 - 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß die festphasengebundenen Bindungsmoleküle auf Beads angeordnet sind.
21. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach Anspruch 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß die markierten Replikate mit Durchflußdetektoren nachgewiesen werden.
22. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der Ansprüche 1 - 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß die festphasengebundenen Bindungsmoleküle oder die immobilisierten Biomoleküle in einem biologischen Präparat angeordnet sind.
23. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach Anspruch 22, **dadurch gekennzeichnet**, daß das biologische Präparat ein histologischer Schnitt, ein Gefrierbruchpräparat oder ein Western-Blot ist.
24. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nachzuweisenden Biomoleküle Aminosäuren, Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Lipide oder Rezeptoren sind.

25. Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bindungsmoleküle Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder andere spezifisch bindende Moleküle sind.
26. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen, bei dem
eine erste Substanz, die Teil eines nukleinsäurereplizierenden Apparates ist und ein Kupplungselement aufweist,
mit hochmolekularen Nukleinsäuremolekülen und Mononukleotiden verschiedener Spezies, von denen mindestens die Mononukleotide einer Spezies mit einer detektierbaren Markierung versehen sind, sowie einer zweiten Substanz inkubiert wird, die die erste Substanz zu einem funktionsfähigen replizierenden Apparat für hochmolekulare Nukleinsäuren ergänzt, dergestalt, daß
der so gebildete Apparat die hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle bindet und unter Einbau markierter Mononukleotide Replikate der hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle erzeugt, die nicht abdissoziieren.
27. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Kupplungselement eine funktionelle Gruppe ist, die mit zu bindenden Molekülen eine kovalente Bindung eingehen kann.
28. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 26, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Kupplungselement Bestandteil eines Linkersystems ist, über das die zu bindenden Moleküle gebunden werden können.

29. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 28, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Linkersystem aus der Gruppe gewählt ist, die das Biotin-Streptavidin-System, das ULS-Platin-Linkersystem, das Digoxigenin-System, ein Antigen-Antikörper-System oder ein anderes spezifisch bindendes System umfaßt.
30. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz über das Kupplungselement mit einem Bindungsmolekül verbunden wird, das in der Lage ist, ein Biomolekül spezifisch zu binden.
31. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 29, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz über das Kupplungselement mit einem Biomolekül verbunden wird.
32. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß Anspruch 30, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Bindungsmoleküle Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Rezeptoren oder andere spezifisch bindende Moleküle sind.
33. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 30 bis 32, **dadurch gekennzeichnet**, daß die nachzuweisenden Biomoleküle Aminosäuren, Proteine, Zucker, Nukleinsäuren, Antikörper, Lektine, Lipide oder Rezeptoren sind.
34. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 33, **dadurch gekennzeichnet**, daß

die erste Substanz die β -Untereinheit einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz die restlichen erforderlichen Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.

35. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz eine oder mehrere Untereinheiten einer DNA-Polymerase III ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III sowie eventuell weitere erforderliche Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.
36. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält und die zweite Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist.
37. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz eine DNA-Polymerase I, das Klenow-Fragment einer DNA-Polymerase I, die Taq-DNA-Polymerase oder eine andere DNA-Polymerase ist und die zweite Substanz β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III enthält.
38. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 34, **dadurch gekennzeichnet**, daß die erste Substanz zusätzlich der jeweils eingesetzten zweiten Substanz mit weiteren β -Untereinheiten einer DNA-Polymerase III inkubiert wird.

39. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 38, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine zirkuläre Form aufweisen.
40. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 39, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle jeweils eine Replikationsorigin-Sequenz aufweisen.
41. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 40, **dadurch gekennzeichnet**, daß die zu replizierenden hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle eine Länge von mindestens 10 kB aufweisen.
42. Verfahren zur Herstellung eines Markers zum Nachweis von Biomolekülen gemäß einem der Ansprüche 26 - 41, **dadurch gekennzeichnet**, daß die detektierbare Markierung mindestens einer der zugefügten Mononukleotidspezies aus einer fluoreszierenden, lumineszierenden, radioaktiven, oder enzymatischen Markierung besteht.
43. Marker zum Nachweis von Biomolekülen, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mit einem Verfahren gemäß der Ansprüche 26 - 42 hergestellt wurde.

Patentanwälte Schaefer & Emmel

European Patent Attorneys

Dipl. - Phys. Konrad Schaefer

Dipl. - Biol. Dr. Thomas Emmel

Tel:(0)-40-6562051 Fax:-6567919

Gehölzweg 20, D-22043 Hamburg

Commerzbank 22 / 58226 Blz 200 40 000
Postbank 225058 - 208 Blz 200 10 020

15. Juli 2003

Uns. Zeichen: 03485

Eppendorf AG

Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen

Zusammenfassung

Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen, bei dem die nachzuweisenden Biomoleküle mit einer ersten Substanz gekoppelt werden, die Teil eines nukleinsäurereplizierenden Apparates ist, die gebildeten Biomolekül-Substanz-Komplexe an für die jeweiligen Biomoleküle spezifische, festphasengebundene Bindungsmoleküle gebunden werden, ggf. die nicht gebundenen Biomolekül-Substanz-Komplexe durch Waschen entfernt werden, die gebundenen Biomolekül-Substanz-Komplexe mit hochmolekularen Nukleinsäuremolekülen und Mononukleotiden verschiedener Spezies, von denen mindestens die Mononukleotide einer Spezies mit einer detektierbaren Markierung versehen sind, sowie einer zweiten Substanz inkubiert werden, die die an die Biomoleküle gekoppelte erste Substanz zu einem funktionsfähigen replizierenden Apparat für hochmolekulare Nukleinsäuren ergänzt, der die hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle bindet und unter Einbau markierter Mononukleotide Replikate der hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle erzeugt, die nicht abdissoziieren, ggf. die in Lösung befindlichen

hochmolekularen Nukleinsäuremoleküle und Mononukleotide durch Waschen entfernt werden, und über den Nachweis der markierten Replikate die zu detektierenden Biomoleküle bestimmt werden.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.